

葉緑体新規タンパク質 LIL8 の解析

加藤 由佳子¹、田中 亮一²、高林 厚史²、田中 歩²

1. 技術部先端技術支援室
2. 生物環境部門生物適応分野

はじめに

植物は光合成によって光エネルギーから生命を維持するのに必要なエネルギーを得ている。光合成には多くのタンパク質が関与する。複合体の組み立て、集光、反応の触媒など、様々なタンパク質が働く複雑な機構によって光合成は成り立っている。植物は進化の過程で、新しく遺伝子を取り込んだり、また失ったりしてきた。それによって光合成で働くタンパク質もまた変化している。それらのタンパク質について知ることは、光合成全体についての理解を深め、より効率よく光合成することについての知見につながると考えられる。

目的

LHC タンパク質 (light-harvesting chlorophyll-binding protein) は光合成反応において光を集めるアンテナの形成に関与するタンパク質である。植物の持つタンパク質の約 7 割を占める重要なタンパク質であるが、植物の祖先とされるシアノバクテリアは LHC タンパク質を持っていない。しかしその一方で、シアノバクテリアは植物と同じく Light-harvesting like protein (LIL) と呼ばれるタンパク質を持っている。LIL タンパク質は現在までに 7 つ知られており、構造は LHC タンパク質と似ている。LHC タンパク質はこれまでよく研究されているが、LIL タンパク質についてはその機能がよくわかっていない。

今回、植物の実験でモデル植物として広く用いられているシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* の遺伝子配列から、新しく LIL の構造を持ったタンパク質をコードする配列を見つけた。そのコードされるタンパク質を LIL8 と名付け、その局在や機能等について調べたので報告する。LIL8 タンパク質の解析は、まだその機能等について知られていない他の LIL タンパク質について知る手がかりとなることを期待したい。

実験に使用した植物について

実験には LIL8 をコードする遺伝子に変異をもつシロイヌナズナの変異体をアメリカのストックセンター (ABRC) から取り寄せた。それらの変異体を *li18-1* と *li18-2* と呼ぶ。

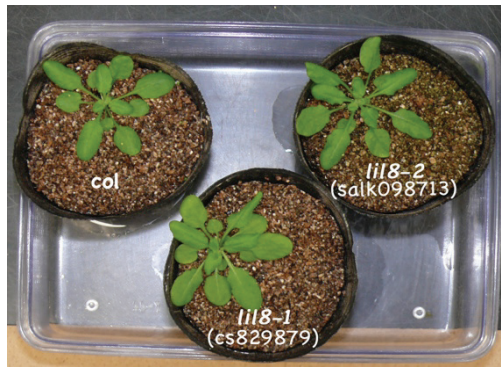


図1 実験に使用した植物。*lil8* 欠損株 (*lil8-1* と *lil8-2*) と野生型の Col。成長や外見上の差異は見られなかった。

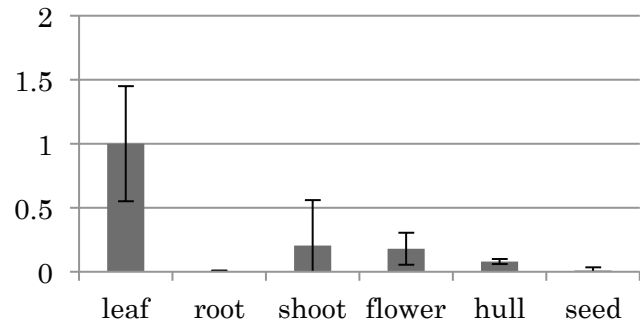


図2 シロイヌナズナの各器官における LIL8 の発現量 (葉を 1 としたときの相対値)。リアルタイム PCR により発現量を調べたところ、葉で多く発現していることが分かった。

実験にはこれら 2 種類の変異体と野生型の Columbia (Col) を用いた。2 つの変異株について Col と比較すると、成長過程における外見上の違いは見られなかった (図 1)。

また、これら 2 つの変異株については、DNA シークエンシングによって、LIL8 をコードする遺伝子の 5'UTR*1 に短い配列が挿入されていることを確認している。またウエスタンブロッティングとリアルタイム PCR (方法については後述) によって *lil8-1* と *lil8-2* はともに LIL8 がほとんど発現していないことを確認している。

LIL8 の局在

LIL8 の組織間での発現パターンの違いをリアルタイム PCR で調べた。また細胞内の局在について、YFP を導入した形質転換体の観察、ウエスタンブロッティングの 3 つの方法で確認した。

リアルタイム PCR では PCR (ポリメラーゼ連鎖反応 : polymerase chain reaction) による DNA の増幅を経時的にモニタリングすることで鋳型 DNA を定量し、目的のタンパク質の発現量を知ることができる。Col の葉、茎、根、花、さや、種の mRNA を抽出し、cDNA*2 を合成した。その cDNA を用いてリアルタイム PCR を行なった結果を図 2 に示した。LIL8 は葉で最も多く発現し、茎などでもわずかに発現していることが分かった。光合成をしている器官で多く発現していると言える。

次に、遺伝子組み換えにより目的タンパク質である LIL8 と蛍光物質である YFP (黄色蛍光タンパク質 : Yellow Fluorescent Protein) が結合したものを Col または *lil8-2* で発現させた形質転換体を、顕微鏡で蛍光を観察した。図 3 に示したように、クロロフィルの蛍光と YFP の蛍光が重なり、LIL8 は葉緑体に局在することが示唆された。

*1 非翻訳領域。タンパク質に翻訳されない領域。タンパク質の発現を調節する。

*2 相補的 DNA。mRNA を鋳型にして逆転写酵素によって合成された DNA。

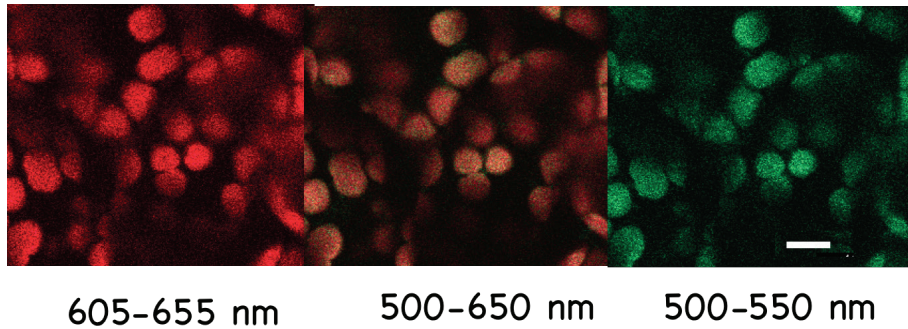


図3 蛍光観察の結果(*lil8-2*へ LIL8 + YFP を導入したもの)。左が葉緑体の蛍光、右が YFP の蛍光、中央が両者をあわせたもの。葉緑体と YFP の蛍光が重なり、LIL8 は葉緑体に存在することが分かった。

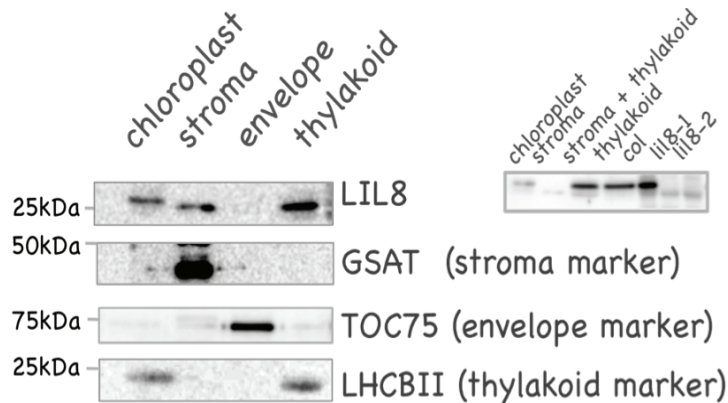


図4 ウェスタンブロッティングによる LIL8 の検出。左から葉緑体、ストロマ画分、包膜画分、チラコイド膜画分を電気泳動した。LIL8 抗体による免疫染色でチラコイド膜に特異的なバンドが見られた (ストロマに見えているバンドは非特異的バンド)。

さらに、ウェスタンブロッティングにより葉緑体のどの画分に局在するのかを調べた。ウェスタンブロッティングでは、SDS-PAGE (SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動: sodium dodecyl sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) により分子量によって分離したタンパク質をメンブレンに転写し、免疫染色を行なう。最初に Col の葉を破碎して葉緑体を抽出した (田中、2008)。その後シヨ糖密度勾配超遠心分離により、葉緑体の膜成分であるチラコイド、基質であるストロマ、葉緑体を包んでいる包膜の 3 つの組織に分画した。それらのウェスタンブロッティングの結果を図 4 に示した。LIL8 抗体による染色では、葉緑体中のチラコイド膜画分で大きさが約 25 kDa の LIL8 バンドが検出された。ストロマ画分でもほぼ同じ大きさの位置にバンドが検出されたが、変異株やストロマとチラコイドを同時に泳動した結果から、ストロマ画分のバンドは抗体の非特異的な反応によるものであることがわかった。すなわち、LIL8 は光合成の化学反応の場である葉緑体のチラコイドに局在するタンパク質である。

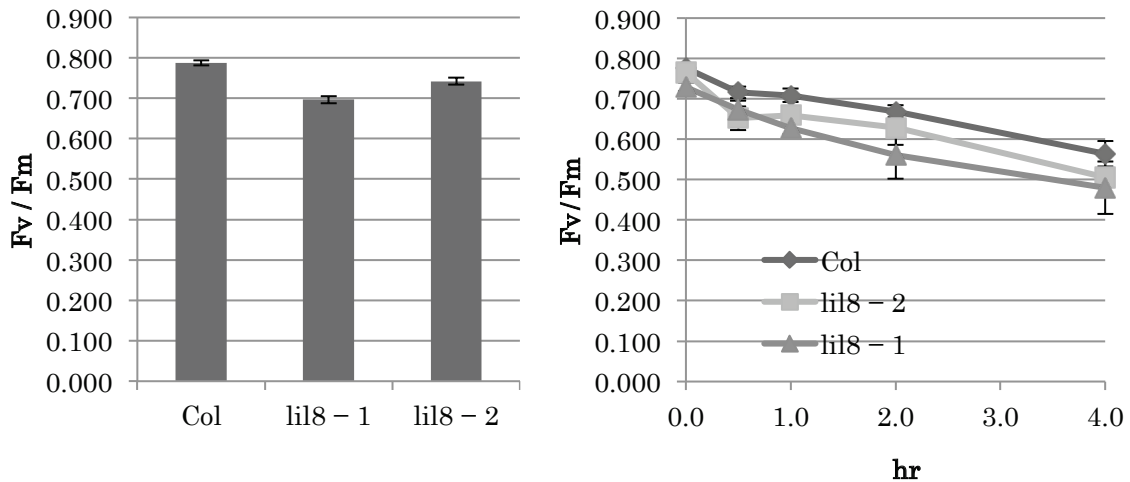


図5 変異体の光合成効率。左：*lil8-1*と*lil8-2*では、Colに比べて光合成効率が低かった。右：強光条件に置いて経時的に光合成効率を測定すると、変異体では光合成効率がより低下していた。

LIL8の機能について

ある植物がどのくらい光合成をできる能力を持っているのか、その指標であるクロロフィル蛍光の最大量子収率 F_v/F_m をパルス変調蛍光測定 (PAM) によって調べた。最大量子収率 F_v/F_m が大きいほど、受けた光を効率よく光合成に用いることができる。*lil8-1*と*lil8-2*はColに比べて F_v/F_m の値が小さく、光合成効率が低かった(図5)。また、2つの*lil8*変異体とColについて、強光条件(約 $1200 \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$)に置いたときの光合成効率を経時的に測定した。一般的に強光条件においては、光合成で利用しきれなかった過剰な光エネルギーにより光合成効率が低下することが知られている。LIL8を持たない変異体では、Colに比べてより強光条件に弱く、光合成効率が低下することが分かった(図5)。これらの結果から、LIL8は光合成に関与する可能性がある。

今後の実験について

これまでの実験で、LIL8が葉緑体中に存在し、光合成に何らかの形で関与していることが示された。たとえばLILタンパク質が光合成に関与するタンパク質組み立ての足場を形成するなどの働きも考えられる。今後はLIL8が葉緑体チラコイド膜中でどのように存在し(複合体形成の有無など)、どのような働きをしているのかを中心に実験を進めて行く予定である。

参考文献

田中 亮一、田中 歩 「高等植物の葉緑体に置けるプロテアーゼの研究」北海道大学低温科学研究部技術報告、**13**、1-2、2008年3月。